應用YAC基因庫(酵母菌人工染色體)於作物種原保存與基因體之研究

農試所種原組 王芝鈺 黃勝忠

一、前言

作物種原為品種改良之根本，因此世界各國以品種改良為目的之研究單位，無不窮盡心力的蒐集相關的作物種原。近十幾年來隨著分子生物技術的進步，種間基因交換的藩籬也逐漸打破。使得優良作物所擁有的特殊基因頓時變得非常重要，因為現在只要利用基因選殖技術取得該基因，便有機會轉殖到同種或甚至是不同種的作物，使得傳統品種改良更快速，與配合分子技術育種成功的可能性也更大。

二、基因體庫(Genomic library)

基因選殖技術首重選殖系的取得，基因選殖時如果基因序列已知，便可利用該序列設計引子進行PCR增殖目標片段；可是如果基因序列未知，因為無法取得該基因產物以致無法推知基因序列，這時就必須製備基因體庫，再從其中篩選含有目標片段的選殖系。基因體庫種類繁多，以載體種類區分計有：人工染色體、粘質體、嗜菌體置換型、質體等多種類型。其中以人工染色體為載體者之選殖容量最大，較適於作物遺傳資源保存及真核基因體研究；而其中又以YAC (Yeast artificial chromosome；酵母菌人工染色體)基因體庫容量最大，也是唯一以真核生物為宿主的基因體庫（表一）。

作　　者：黃研究員兼組長勝忠
連絡電話：04-233302301-7800

三、YAC基因庫之發展

最初由於侷限於分子生物技術的發展，所能選殖的DNA片段長度都相當的短。直到1987年Burke利用脈衝電泳(Pulse Field Gel Electrophoresis)及酵母菌人工染色體，才順利的選殖到數百kb的DNA，並建立人類YAC基因庫。此後YAC基因庫的應用性逐漸受到重視，最初是利用物理圖譜尋找基因座，許多作物的優良性狀基因，雖然已知其與鄰近遺傳標誌的相對距離，可是因為兩相鄰遺傳標誌間距通常大於數千kb，如搭配YAC基因庫將基因解析度提高到數百kb，可提高選殖成功率。

目前YAC的缺點是其嵌合體及遺傳穩定性較低，另外宿主生長速度慢、操作流程繁複、脈衝電泳的使用，以及隨後出現的BAC及PAC技術，造成應用性受到侷限的原因。然而由於YAC基因庫具有最大的選殖容量及真核生物宿主，再加以技術不斷的研發改進，現在YAC技術已較為簡便，而且應用性也更高。

四、YAC基因庫的應用

(一)應用於大型基因、大型DNA片段或基因群研究

研究大型基因的遠端調控元素及順式調控序列，或是轉入大型DNA片段以補償或糾正某些基因，藉以確認基因功能。

(二)建構物理圖譜

2004年完成的國際水稻基因體定序計畫(International Rice Genome Sequencing Project，IRGSP)，雜亂的DNA片段就是先利用YAC基因庫進行初步排序，再利用BAC基因庫作細部排序，組裝成完整的水稻基因體序列。

(三)據圖選殖

許多作物的優良基因，利用遺傳育種分析，僅能得知其與遺傳標誌的相對位置，無法進一步的取得基因表達產物，以致無法推測基因序列進行基因選殖。而據圖選殖便是利用YAC基因庫進行染色體步移(Chromosome walking)以選殖取得目標基因。

(四)基因轉殖工具

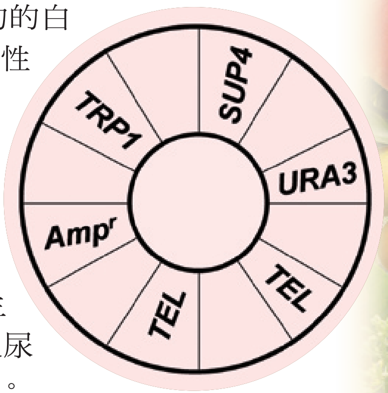
由於利用YAC基因轉殖特有的同源重組基因特性，相較於其他基因轉殖法，例如基因槍或是以微生物為媒介者，可以更忠實的呈現轉殖基因之表達、組織專一性及發育時期專一性等。另外不同於一般的基因轉殖僅單純的轉入目標基因，利用YAC轉殖可以轉入大片段DNA且內含許多基因。

(五)生物遺傳資源保存

目前已有許多生物基因利用YAC製備基因庫保存，在植物方面有阿拉伯芥、水稻、大麥、玉米、菸草、番茄、馬鈴薯等，在動物方面有人、老鼠、斑馬魚等。此外中國也利用YAC基因庫保存瀕危畜禽品種。

五、YAC載體組成份

YAC所採用載體以pYAC4（圖一）為例，包含元素如下：(一)端粒重複序列(*TEL*)：形成穩定的染色體末端。(二)*SUP4*內部的轉殖位置：選殖成功的菌落，因其*SUP4*基因被插入影響基因表現，因此在篩選培養基上呈現紅色，異於選殖失敗菌落的的白色。(三)青黴素抗性標記基因(Amp^r)：便於利用大腸桿菌增殖載體。(四)營養缺陷標誌*TRP1*及*URA3*：使得轉殖株可以生長於缺乏色胺酸及尿嘧啶的篩選培養基。



圖一、pYAC4載體。

表一、人工合成染色體基因庫所用載體對照表

項　目	YAC	BAC	PAC
英文全名	Yeast artificial chromosome	Bacterial artificial chromosome	P1 artificial chromosome
中文全名	酵母菌人工染色體	細菌人工染色體	嗜菌體人工染色體
選殖容量	>1 Mbp	~300 kbp	~300 kbp
宿主	真核(酵母菌)	原核(大腸桿菌)	原核(大腸桿菌)
穩定性[z]	非常不穩定	非常穩定	非常穩定
嵌合體機率[y]	可能大於50%	非常低	非常低

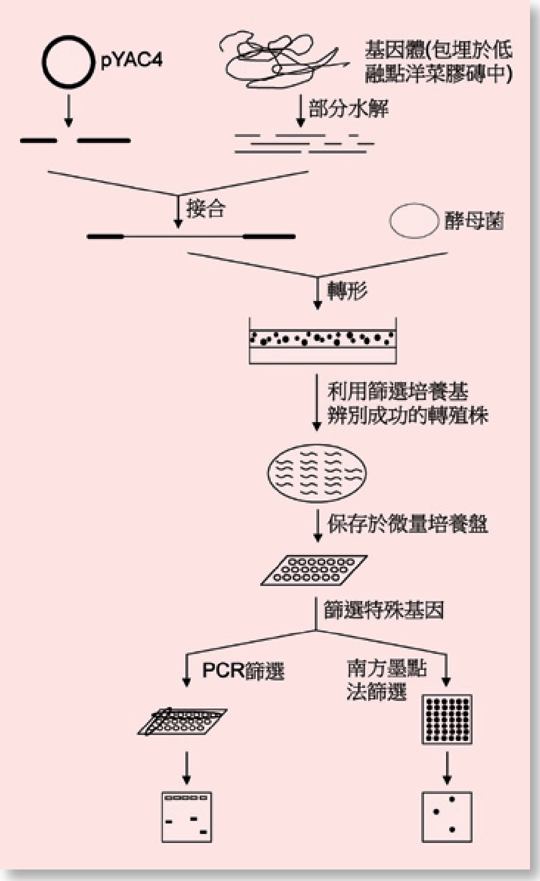
[z] 穩定性：宿主經若干代的繁殖後，其內所含的人工染色體的完整度。

[y] 嵌合體：非連續的基因體片段被選殖進入同一個載體。

六、YAC基因庫的製備及篩選

YAC基因庫製備流程（圖二）：先萃取作物高分子量基因體DNA，因其結構脆弱易斷需要包埋於洋菜膠中進行後續操作，而且洋菜膠有助於DNA用量的控制。高分子量基因體DNA經部分水解後與載體臂接合並轉形到酵母菌宿主，利用營養缺陷篩選培養基判別轉形成功的菌株，再分裝於微量培養盤以長期保存。

製備流程中較困難或耗時處在於：（1）轉形效率低。（2）轉形後的酵母菌原生質球再生耗時。（3）若無機械手臂協助，轉殖株的人工辨識及挑取耗時。（4）重組基因片段長分析時需利用脈衝電泳。



圖二、YAC基因庫的製備及篩選。

YAC基因庫所含轉殖之株數常用篩選方法有兩種：PCR篩選及雜交篩選。PCR篩選是先將所有的轉殖株分成若干組分別進行混合，利用不同的分組模式搭配PCR，便可快速又準確的篩出目標轉殖株。雜交篩選是利用機械手臂將微量培養盤上的菌株密集點佈於雜交濾膜表面，長寬各22公分的濾膜上，可以點佈高達兩萬個菌落，隨後再利用南方墨點法篩選目標轉殖株。

七、台灣YAC基因庫發展現況

國內最先應用此一技術的是1999年中研院的研究團隊製備縐葉菸草YAC基因庫，並利用螢光原位雜交定位縐葉菸草的酵母菌人工染色體轉殖株。而2004年完成的國際水稻基因體定序計畫，則是利用YAC基因庫完成DNA片段的排序。目前農業試驗所國家作物種原中心，正積極建立作物YAC基因庫製備系統，希望利用此系統保存重要作物遺傳資源，並促進基因體相關研究，種原中心擁有的重要儀器有脈衝電泳系統及自動點片機，有助於進行YAC基因庫之建構。

八、結語

利用YAC基因庫保存作物遺傳資源，可保存大片段的植物基因體，長度從數百kb到1Mb左右，並可應用於大型基因、大型DNA片段或基因群、物理圖譜、據圖選殖、基因轉殖等相關研究，YAC基因庫為傳統遺傳育種學與分子生物學搭起互補橋樑。某些作物品種已知其品質優異或是具有特殊功能性基因，例如中草藥植物台灣原生黃花石斛，利用YAC基因庫先保存其DNA遺傳資源，待爾後研究人員可對某些特殊功能基因進行深入研究，或可以直接篩選有用的功能性基因。